

星点设计-效应面法优选丹参提取工艺

黄元红^{1*}, 卫天喜¹, 张发生¹, 杨军宣²

(1. 雅安三九药业有限公司, 四川 雅安 625000; 2. 成都中医药大学药学院, 成都 611137)

[摘要] 目的: 星点设计-效应面法优选丹参的提取工艺。方法: 以丹参酮_A和丹酚酸 B 提取率, 收膏率为考察指标, 采用星点设计考察提取乙醇用量、提取时间以及乙醇浓度对提取工艺的影响, 对结果进行多元线性回归和二项式拟合, 用效应面法选择较佳工艺条件, 并进行预测分析。结果: 复相关系数上看, 各项指标二项式拟合方程均优于多元线性回归方程, 确定最优提取工艺为加 9 倍量 60% 乙醇提取 3 次, 每次 1.5 h, 提取量预测值与理论值偏差小于 3%。结论: 星点设计-效应面法优选丹参的提取工艺, 方法简便, 预测性良好。

[关键词] 丹参; 星点设计; 效应面法; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0028-04

Optimal Extraction of Effective Constituents from Radix Salvia Based on Central Composite Design/Response Surface Methodology

HUANG Yuan-hong^{1*}, WEI Tian-xi¹, ZHANG Fa-sheng¹, YANG Jun-xuan²

(1. Ya an Sanjiu Pharmaceutical Co. Ltd., Ya an 625000, China;

2. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] Objective: To optimize the process of extracting effective constituents from Radix Salvia by central composite design/response surface methodology. **Method:** The effects of influence factors such as solvent fold, ethanol concentration and extract time on extraction rate of tanshinone_a and salvianolic acid were investigated by using box-behnken design and response surface method. The data were imitated using multi-linear equation and second-order polynomial equation. **Result:** Multiple correlation coefficients from second-order polynomial equation were prior to those from multi-linear equation. The optimum condition of extraction process was 9 fold solvent, 1.5 hours for decoction, and 3 times for extraction; the ethanol concentration was 60%. Bias between observed and predicted values was less than 3%. **Conclusion:** The optimum model was highly predictive.

[Key words] Radix Salvia; central composite design; response surface methodology; extraction process

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge 干燥根及根茎。丹参的脂溶性有效部位主要为二萜类化合物: 以丹参酮_A、隐丹参酮、丹参酮 I 含量较高, 其他为微量成分。其中丹参酮_A 活性强, 含量高, 具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、抗雄性激素等药理作用, 多作为工艺研究的指标性成分; 水溶性成分中酚

酸类化合物, 是活血化瘀的有效成分, 具有保护脑损伤、心脏以及抗氧化等作用, 其中的丹酚酸 B 也常被作为指标性成分^[1]。

目前国内多采取正交设计或均匀设计法优化中药的提取工艺, 这两种方法多采用线性数学模型, 虽有简便、试验次数较少等优点, 但精度不太高。虽然丹参已有较成熟的提取工艺, 一般为醇提后水提, 由于耗时较多, 生产周期较长, 多次加热易使有效成分损失。而星点设计 (central composite design, CCD)^[2] 由于其精密度高、预测值接近真实值, 是近年常用的设计方法。本试验引入 CCD 方法, 结合效

[收稿日期] 20100712(005)

[通讯作者] * 黄元红, 工程师, 从事药品质量管理, Tel: 0835-2876093, E-mail: huangyuanhong@ ya999.com

应面法优选丹参的提取工艺,旨在尽可能多地提取有效成分,简化水提工艺的同时,为探讨星点设计-效应面法应用于中药提取工艺的可行性提供依据。

1 仪器与试剂

戴安高效液相色谱仪(P680 四元泵, TCC-100 型柱温箱, ASI-100 型自动进样器, UVD170U 型紫外检测器); FA1104 型上皿电子天平(上海精科仪器厂); BP211D 型 sartorius 电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm ×150 mm, 5 μm); TGL-16G 型高速离心机(上海安亭科学仪器有限公司)。

丹参酮 A 对照品(批号 0823-9802)、丹酚酸 B 对照品(批号 111562-200302) 购自中国药品生物制品检定所(纯度为供含量测定用)。甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 丹参酮 A 测定方法

2.1.1 色谱条件 参照 2010 年版《中国药典》一部丹参项下含量测定方法。色谱柱 Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm ×150 mm, 5 μm); 流动相 甲醇-水(70/25); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 270 nm。

2.1.2 标准曲线制备 精密称取丹参酮 A 对照品适量,置 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇制成 200 mg·L⁻¹,精密吸取 1 mL 置 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇释至刻度,配制成 20 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。分别进样 8, 10, 12, 14, 16, 20 μL, 记录峰面积,以丹参酮 A 进样量 X(μg) 为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,得回归方程 $Y=9.12X+0.0513$, $r=0.9999$ 。结果表明,丹参酮 A 的进样量在 0.016 ~0.400 μg 线性关系良好。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取所提取的浸膏粉 0.4 g 置 50 mL 量瓶中,加入甲醇 40 mL,超声使溶解,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.2 丹酚酸 B 测定方法

2.2.1 色谱条件 参照 2010 年版《中国药典》一部丹参项下丹参酚酸 B 含量测定方法。色谱柱 Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm ×150 mm, 5 μm); 流动相 甲醇-乙腈-甲酸-水(30/10/1/59); 检测波长 286 nm; 柱温 30 °C; 流速 1.0 mL·min⁻¹。

2.2.2 标准曲线制备 精密称得丹参酚酸 B 对照品 4.00 mg, 置 25 mL 量瓶中,加 75% 甲醇稀释成 0.16 g·L⁻¹ 的对照溶液,分别吸取 2, 6, 10, 14, 18, 22

μL 注入液相色谱仪,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得标准曲线 $Y=17.16X-1.471$, $r=0.9998$,表明丹酚酸 B 进样量在 0.32 ~3.52 μg 时,峰面积与进样量线性关系良好。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取所提取的浸膏粉 0.1 g 置 50 mL 量瓶中,加入 75% 甲醇 40 mL,超声使溶解,加 75% 甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.3 丹参药材含量测定 依照《中国药典》2010 年版一部丹参项下含量测定方法测定药材 3 批,丹参酮 A 和丹酚酸 B 平均质量分数分别为 3.44, 74.49 mg·g⁻¹。

2.4 丹参提取工艺优化

2.4.1 星点试验设计与结果 考察因素为乙醇浓度,提取次数,提取时间和溶剂用量,因提取次数为非连续变量,回归处理较困难,结合预试验结果和工业生产的实际,暂固定为 3 次,其余因素的水平据预试验的结果而定。根据星点设计的原理,每因素设 5 水平,用代码值 -1, 0, 1, 来表示(3 因素星点设计的 $\alpha=1.732$)。代码值所代表的实际操作物理量见表 1, 试验安排与结果见表 2。

表 1 丹参提取工艺优化星点试验因素水平

因素	水平				
	1.732	-1	0	1	1.732
X ₁ 溶剂用量 / 倍	6	7.27	9	10.73	12
X ₂ 提取时间 / h	0.5	0.92	1.5	2.08	2.5
X ₃ 乙醇体积分数 / %	30	42.68	60	77.32	90

按照试验设计的统计学要求,各组试验的安排见表 2, 试验模型通过最小二乘法拟合二次多项式方程可以表达为:

$$Y = A_0 + A_1X_1 + A_{11}X_1^2 + A_{12}X_1X_2$$

其中 Y 为效应值(丹参酮 A 提取量 Y₁、丹参酚酸提取量 Y₂、有效成分总量 Y₃、出膏率 Y₄), A₀, A_i, A_{ii}, A_{ij} 为方程系数, X_i, X_j (i=1, 3; j=i) 为自变量编码值。多项式模型方程拟合的性质由确定系数 R² 表达,其统计学上的显著性由 F 值检验;采用 design expert 7.0 软件分析。

2.4.2 工艺优化 从以下拟合方程的相关系数来看,二次多项式拟合相关系数显著高于线性回归,采用二项式方程拟合的效果好。线性方程:

$$Y_1 = 2.27 + 0.16X_1 + 0.30X_2 + 0.26X_3 (R^2 = 0.3855, P < 0.05)$$

表 2 丹参提取工艺星点试验设计与结果

No.	X_1	X_2	X_3	Y_1 丹参酮 A/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	Y_2 丹参酚酸 B/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	Y_3 总量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	Y_4 出膏率/%
1	-1	-1	-1	1.02	60.82	61.84	35.2
2	1	-1	-1	1.28	79.83	81.11	39.88
3	-1	1	-1	1.54	58.21	59.75	34.28
4	1	1	-1	2.45	69.34	71.79	44.37
5	-1	-1	1	1.65	47.34	48.99	36.34
6	1	-1	1	2.29	56.34	58.63	39.45
7	-1	1	1	2.89	55.34	58.23	35.65
8	1	1	1	3.23	68.34	71.57	39.45
9	-1.732	0	0	2.63	76.94	79.57	42.12
10	1.732	0	0	2.69	77.34	80.03	46.23
11	0	-1.732	0	2.12	59.34	61.46	38.45
12	0	1.732	0	2.32	80.43	82.75	40.34
13	0	0	-1.732	1.75	65.34	67.09	40.98
14	0	0	1.732	1.65	55.34	56.99	41.23
15	0	0	0	2.67	69.34	72.01	45.34
16	0	0	0	2.61	70.45	73.06	45.23
17	0	0	0	2.63	70.23	72.86	46.01
18	0	0	0	2.69	69.89	72.58	45.89
19	0	0	0	2.63	70.38	73.01	45.23
20	0	0	0	2.64	69.56	72.2	45.98

注: Y_1 与 Y_2 为从药材中提取出有效成分含量,即提取出来的有效成分量与药材量的百分比。

$$Y_2 = 66.51 + 3.77X_1 + 3.10X_2 - 4.15X_3 \quad (R^2 = 0.3700, P < 0.05)$$

$$Y_3 = 68.78 + 3.93X_1 + 3.40X_2 - 3.90X_3 \quad (R^2 = 0.3635, P < 0.05)$$

$$Y_4 = 41.38 + 2.06X_1 + 0.44X_2 - 0.17X_3 \quad (R^2 = 0.2027, P < 0.05)$$

二项式回归方程:

$$Y_1 = 2.62 + 0.16X_1 + 0.30X_2 + 0.26X_3 - 0.17X_2^2 - 0.34X_3^2 \quad (R^2 = 0.7062, P < 0.05)$$

$$Y_2 = 69.68 + 3.77X_1 + 0.310X_2 - 4.15X_3 + 4.14X_2 X_3 - 4.54X_3^2 \quad (R^2 = 0.6722, P < 0.05)$$

$$Y_3 = 72.18 + 3.93X_1 + 3.40X_2 - 3.90X_3 + 4.20X_2 X_3 - 4.86X_3^2 \quad (R^2 = 0.6851, P < 0.05)$$

$$Y_4 = 45.61 + 2.06X_1 - 0.98X_1 X_3 - 1.14X_1^2 - 2.74X_2^2 - 2.17X_3^2 \quad (R^2 = 0.7926, P < 0.05)$$

由效应面图(1~3)可知,选择效应面图上丹参酮 A,丹参酚酸 B 含量、总量以及收膏率指标大的区域,可求得提取工艺最佳工艺参数,自变量的最佳范围见表 3。

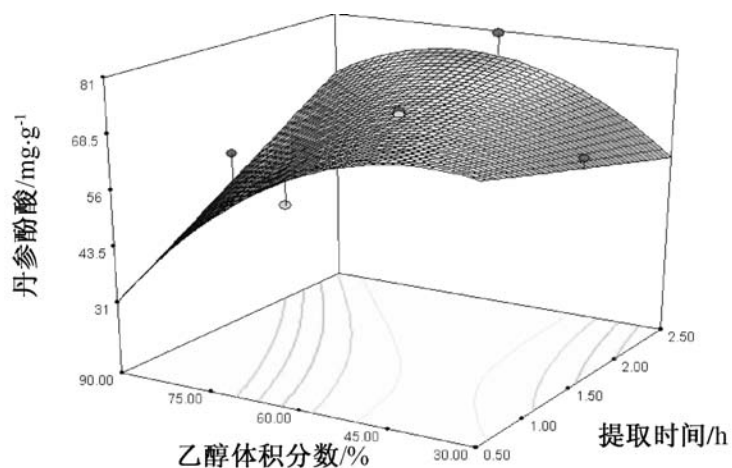


图 1 乙醇浓度与提取时间对丹参中丹参酚酸 B 提取的影响

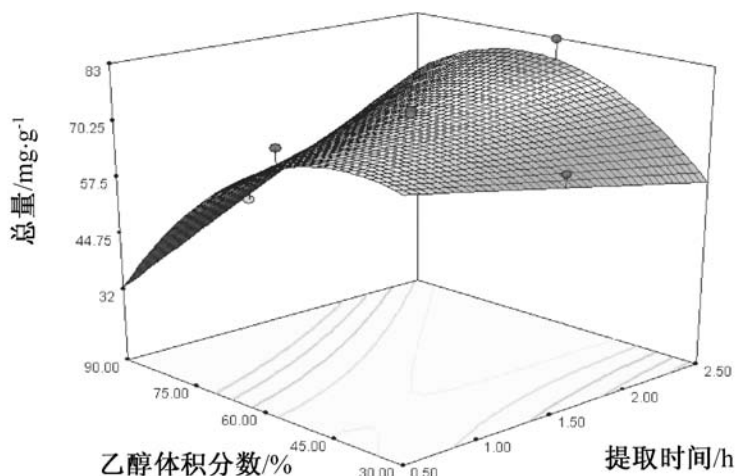


图 2 乙醇浓度与提取时间对丹参中丹参酮 A 与丹参酚酸 B 总量提取的影响

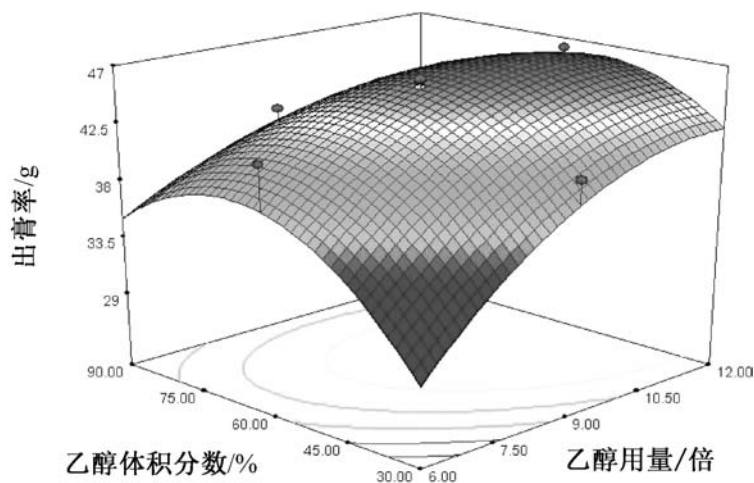


图 3 乙醇体积分数与乙醇用量对丹参收膏率的影响

表 3 效应面优化的最优提取工艺参数范围

评价指标	X_1	X_2	X_3
Y_2	9	2 ~2.5	60 ~75
Y_3	9	1.5 ~2.5	50 ~70
Y_4	9 ~11.5	1.5	55 ~65

根据自变量最优预测范围, 选取最佳工艺条件: 用 9 倍量 60% 乙醇, 提取 1.5 h, 根据优化的处方, 提取 3 批样品, 各考察指标与预测值相比较, 偏差都较小, 表明所建立的数学模型具有良好的预测性, 所选的条件重复性良好, 验证了工艺可行性, 如表 4。

表 4 3 批样品最佳工艺验证试验

评价指标	预测值	实测值	偏差 / %
Y_1	2.62	2.64 ±0.03	0.95
Y_2	69.68	69.98 ±0.46	0.42
Y_3	72.18	72.62 ±0.44	0.60
Y_4	44.32	45.61 ±0.38	2.83

3 小结与讨论

星点设计是国外常用的试验设计方法, 国内也有用于优化处方或成型工艺的报道^[3-5], 在优化中药的提取方面也逐渐开始使用^[6]。本试验采用了星点设计-效应面法对丹参提取工艺进行了优化, 其充分考虑到各因素的交互作用, 设计方法简单, 试验次数少, 在中心点进行重复试验以提高试验精度, 同时采

用非线性模型拟合, 复相关系数较高, 可信度较好, 预测值更接近真实值。此方法所得结果更加直观, 便于分析, 同时提高了试验精度, 经验证该方法准确可行, 从而为筛选中药提取工艺参数研究提供了新的试验方法。

本文研究丹参提取工艺, 目的是用较简单的试验步骤提取出丹参中较多的有效成分, 以简便操作、节约成本、并减少因长时间加热而造成丹参有效成分的分解。本试验结合星点试验设计方法深入地对丹参提取工艺参数进行系统考察, 发现提取时间和乙醇浓度, 以及乙醇浓度与乙醇用量的交互作用和变化趋势, 并绘制了效应面图, 有助于深入了解丹参提取过程的变量参数。结合预试验与星点设计-效应面法对丹参提取工艺进行了优化, 最终确定丹参提取的条件是: 9 倍量 60% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 丹参酮_A 和丹酚酸 B 提取率分别为 76% 和 97.5%。

[参考文献]

- [1] 许继文, 付春梅. 丹参的药理作用研究进展 [J]. 医学综述, 2006, 12(23): 1468.
- [2] 吴伟, 崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用 [J]. 国外医学·药学分册, 2000, 27(5): 292.
- [3] 杨勇, 奉建芳, 张慧, 等. 星点设计-效应面法优化蟾酥固体脂质纳米粒制备工艺 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(8): 650.
- [4] 黄健, 高春生, 单利, 等. 星点设计-效应面法在酒石酸美托洛尔缓释微丸处方优化中的应用 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(7): 512.
- [5] 赵栋, 龚涛, 梁湖沂, 等. 星点设计-效应面优化法优化注射用 Cheliensisin A 冻干乳剂 [J]. 华西药学杂志, 2007, 22(3): 275.
- [6] 吴清, 倪宁, 王玉蓉, 等. 星点设计-效应面法优选人参叶酶法提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(4): 5.

[责任编辑 全燕]